

Title	Molecular Mechanism of Oxidative Protein Folding by Soybean Protein Thiol Disulfide Oxidoreductases / ERO1 Pathway(Abstract_要旨)
Author(s)	Matsusaki, Motonori
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2016-09-23
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k20008
Right	許諾条件により本文は2017-09-22に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	松崎 元紀
論文題目	Molecular Mechanism of Oxidative Protein Folding by Soybean Protein Thiol Disulfide Oxidoreductases / ERO1 Pathway （ダイズにおけるプロテインチオールジスルフィド酸化還元酵素とERO1によるタンパク質の酸化的フォールディングの分子機構）		
（論文内容の要旨） ダイズ種子は乾物重量の約35%がタンパク質で占められており、タンパク質の合成および貯蔵能力が高いことから、医薬タンパク質や栄養性・機能性などを付加した高品質化タンパク質などの生産プラットフォームとして高い潜在能力を持っている。ダイズ種子に含まれるタンパク質の大部分は種子貯蔵タンパク質であり、粗面小胞体で生合成された後、ゴルジ体を経由してタンパク質貯蔵液胞に輸送され集積する。種子貯蔵タンパク質のような小胞体で合成される新生タンパク質の大部分は、小胞体内でジスルフィド結合形成を伴って立体構造が形成される（酸化的フォールディング）。正しく立体構造が形成されなかったタンパク質は貯蔵液胞へ輸送されることなく、タンパク質の品質管理装置によって分解される。すなわち、種子を用いた有用タンパク質の効率的な蓄積には小胞体での立体構造形成が必須であり、有用タンパク質の生産系の構築にはタンパク質の小胞体における酸化的フォールディングの分子機構が重要な基盤的知見となる。しかし、植物小胞体での酸化的フォールディングに関する知見は極めて限られている。本研究では、ダイズ小胞体における酸化的フォールディングの分子機構を検討した。			
第1章では、小胞体での新生タンパク質の酸化的フォールディングにおけるジスルフィド結合の供給に中心的な役割を果たす酵素 ER oxidoreductin 1 (ERO1)のダイズオーソログを同定した。酵母や哺乳動物のERO1は、自身の活性中心のジスルフィド結合を使って代表的なprotein thiol disulfide oxidoreductase family protein (PTD0)であるprotein disulfide isomerase (PDI)の活性中心の2個のチオール基をジスルフィドに酸化し、酸化されたPDIが基質である新生タンパク質にジスルフィド結合を形成するとともにフォールディングを完成させる。ダイズにおいても類似の経路が存在していることが予想されたため、ヒトERO1の塩基配列情報を用いてダイズゲノムデータベースに対してホモロジーサーチを行い、相同性が高い <i>GmERO1a</i> および <i>GmERO1b</i> を見だし、それらのcDNAをクローニングした。ウエスタンブロット分析により、 <i>GmERO1a</i> あるいは <i>GmERO1b</i> はダイズのさまざまな組織に53 kDaのタンパク質として普遍的に発現していることを明らかにした。また、ダイズ <i>GmERO1a</i> あるいは <i>GmERO1b</i> は高マンノース型の糖鎖を持つ小胞体膜結合タンパク質であることを示した。種子登熟過程での <i>GmERO1a</i> および <i>GmERO1b</i> から発現したmRNAおよびタンパク質の量は、主要な種子貯蔵タンパク質であるβ-コングリシニンおよびグリシニンの生合成が盛んな時期に上昇すること、 <i>GmERO1a</i> および <i>GmERO1b</i> はフォールディングされていないタンパク質が蓄積する小胞体ストレスに応答してmRNA量が発現誘導されるunfolded protein response 遺伝子であることを見いだした。			
第2章では、リコンビナント <i>GmERO1a</i> の大腸菌発現系を確立し、大量発現させ純化した <i>GmERO1a</i> を用いて酵素学的特性を明らかにした。 <i>GmERO1a</i> は分子内に1分子のFADを補酵素として結合しているオキシダーゼであり、PDI酸化に特化した哺乳動物のERO1とは異なり、小胞体内腔に存在する6種類のPTD0のうち、PDIのダイズオーソログである <i>GmPDIL-1</i> だけでなく <i>GmPDIM</i> 、 <i>GmPDIS-1</i> 、 <i>GmPDIS-2</i> の活性中心を酸化することを見いだした。また、 <i>GmERO1a</i> が産生したジスルフィド結合がこれらのPTD0を介してフォールディング反応のモデル基質であるribonuclease A (RNase A)に転移されることを			

証明した。さらに、GmER01aのCys121とCys146が分子内ジスルフィド結合の架け替えによる活性のオン・オフ制御を担っており、両残基をアラニンに置換した変異GmER01aは野生型GmER01aよりも高い速度でPTD0を酸化するhyperactive enzymeであることを見いだした。

第3章では、複数のPTD0による協同的な酸化のフォールディング系を発見し、その分子メカニズムを明らかにした。新生タンパク質の立体構造形成には、複数のPTD0がフレキシブルなフォールディング複合体を形成して協同的に作用しているとの作業仮説を立て、免疫沈降実験によりダイズ子葉細胞の小胞体に複数種のPTD0会合体を見いだした。これらのうち、GmER01aによって酸化されないため単独では酸化のフォールディング活性を示さないGmPDIL-2が、GmER01によって酸化されるGmPDIMと共存することでRNase Aのジスルフィド結合導入速度とフォールディング速度の両方を劇的に上昇させることを見いだした。その分子メカニズムを探索し、ジスルフィド結合導入速度の上昇はGmPDIL-2の2つの作用に起因することを見いだした。1つはGmPDIMがRNaseAに形成した非天然型ジスルフィド結合をGmPDIL-2が素早く天然型ジスルフィド結合に架け替える作用であり、これはGmPDIL-2の高いフォールディング能力に依存していた。さらに、GmPDIL-2の高いフォールディング能力は2つの活性中心と分子全体のドメイン構造**a-b-b'-a'**が必須であることを明らかにした。他の一つはGmER01aによるGmPDIMの酸化をGmPDIL-2が促進する作用である。さまざまな活性中心変異体を用いて、GmER01aによって生み出されたジスルフィド結合がGmPDIMの2つの活性中心の片方(**a'**ドメインに存在)から、もう片方(**a**ドメインに存在)に転移した後、GmPDIL-2の2つの活性中心に転移する経路を発見し、この経路が作動することによりGmER01aによるGmPDIMの酸化速度が促進されることを明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

植物小胞体におけるタンパク質のジスルフィド結合を伴う立体構造形成(酸化的フォールディング)の分子機構は、植物種子を用いた有用タンパク質の生産系の構築を行うための重要な基盤的知見であるが、生化学的に研究した報告はほとんどない。本研究では、主要作物の中でも突出してタンパク質含量が高いダイズを対象として、酸化的フォールディングの中核である protein thiol disulfide oxidoreductase family protein (PTD0)/ER oxidoreductin1(ER01) 経路を植物で生化学的に初めて証明し、ER01のダイズオースログGmER01aの酵素学的特性を明らかにした。さらに、複数種のPTD0による共同的な酸化的フォールディング系を発見し、その分子機構を明らかにした。評価すべき主要な点は以下の通りである。

1. 植物のER01として初めて活性を有するGmER01aのリコンビナントタンパク質の作製に成功し、GmER01aが複数種のPTD0を酸化する広い基質特異性を有することを見いだした。この発見により、哺乳動物とは異なりPTD0/ER01経路を代替できる別のジスルフィド結合供給系を持たない高等植物では、ER01が複数種のPTD0を酸化することで多様な基質タンパク質の酸化的フォールディングに対応していることが明らかとなった。
2. GmER01の活性制御が、分子内の2つのシステイン残基がかかわるジスルフィド結合の架け替えによって行われていることを明らかにした。
3. ダイズ小胞体内で複数種のPTD0複合体が形成されていることを見いだした。さらに、複合体を形成しているPTD0のうちGmPDIMがGmER01から受け取ったジスルフィド結合を、複合体形成のパートナーであるGmPDIL-2に受け渡す分子間ジスルフィド結合転移反応が存在し、これにより酸化的フォールディングにおけるジスルフィド結合の形成反応が促進されていることを見いだした。以上の発見から、小胞体に複数種のPTD0が存在することの生理的意義の一端が明らかとなった。また、一本のポリペプチド鎖の酸化的フォールディングにおいて、GmPDIMのような基質へのジスルフィド結合導入に適したPTD0と、GmPDIL-2のような架け替えとフォールディングに適したPTD0が、役割を分担しつつ共同的に作用することで、より効率的に反応が進行する新規な分子機構モデルの提案に至った。

以上のように、本論文は、ダイズ種子を用いた有用タンパク質の生産系を構築するための基盤的知見である、小胞体におけるタンパク質の酸化的フォールディングの分子機構を明らかにしたものであり、品質設計開発学、植物生化学、酵素化学、構造生物学の発展に寄与するところ大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成28年8月2日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日: 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)